

for genetic research
DNA Extractor SP Kit
for Serum and Plasma

【Introduction】

“DNA Extraction SP Kit” is a novel extraction kit developed for rapid preparation of circulating DNA in human serum and plasma.

Recently, tumor-specific genes have been amplified and detected in the serum and plasma of patients with various diseases such as lung, breast and colon cancer. Many of these reference articles are currently being published. The research of gene diagnosis using plasma DNA is proceeding to early diagnosis, prognostic value and postoperative surveillance of cancer.

DNA Extractor SP Kit is a powerful pretreatment reagent for the detection and analysis of target DNA because of its high quality and yield. This procedure, using Sodium Iodide (NaI) as a chaotropic agent, can be performed in a simple and safe extraction without hazardous phenol/chloroform. Consequently, the entire DNA extraction procedure is done in a single centrifuge tube.

【Advantages】

- High DNA yield from small amount of serum and plasma

The DNA extraction procedure is based on a simple centrifugal separation using Sodium Iodide and alcohol, that results in less loss of DNA than in solid-phase methods using a silica matrix.

- Safety of operation - Hazardous phenol and chloroform are not employed as reagents for extraction.

- Minimizing the cross and extraneous contamination

The entire extraction of DNA is done in a single centrifuge tube.

- Complete removal of lipids derived from blood using a specialized alcohol solution.

- Extraction of high quality DNA without PCR inhibition

【Kit Contents】

1) Enzyme Reaction Solution	10 mL × 1
2) Protein Digestion Solution	250 μ L × 1
3) Sodium Iodide Solution	15 mL × 1
4) Alcohol Solution	30 mL × 1
5) Washing Solution (A)	50 mL × 1
6) Washing Solution (B)	50 mL × 1

[Materials Needed]**Reagent :**

TE (pH 8.0) or sterile distilled water (D.W.)

Equipments :

- 1) microcentrifuge tubes (1.5 mL or 2 mL)
- 2) vortex mixer
- 3) incubator
- 4) high speed microcentrifuge
- 5) block heater

[Storage and Stability]

Store at 2 ~ 10°C.

The expiry date is printed on the kit label.

[Reactions]

50 reactions (100 μ L of start sample)

25 ~ 30 reactions (200 μ L of start sample)

[Method]**1. Important note before starting**

- If salt precipitation appears in the Sodium Iodide Solution, incubate at 50°C ~ 60°C until the precipitation has dissolved.
- The Protein Digestion Solution should be placed on ice, during operation. Other reagents can be handled at room temperature.
- Samples of serum and plasma should be placed on ice for the avoidance of activation of the endogenous DNase. We recommend that Enzyme Reaction Solution should be added as soon as possible.

2. Standard protocol : 100 μ L sample

1. Dispense 100 μ L of serum or plasma to a plastic 1.5 mL microcentrifuge tube.
2. Add 200 μ L of Enzyme Reaction Solution and mix briefly.
3. Add 5 μ L of Protein Digestion Solution and vortex.
4. Incubate at 56°C for 10 min.

It is possible to store the solution of this step at 4°C or - 20°C for up to one week.
5. Add 300 μ L of Sodium Iodide Solution and mix briefly.
6. Add 600 μ L of Alcohol Solution and vortex.
7. Incubate at room temperature for 10 min.
8. Centrifuge at 12,000 ~ 20,000 \times g for 10 min. at room temperature.
9. Decant and remove the supernatant as much as possible from the tube that is inverted and placed on a paper towel.
10. Add 1mL of Washing Solution (A) to the pellet and vortex.

It is possible to store the solution at - 20°C for long term.
11. Centrifuge at 12,000 ~ 20,000 \times g for 5 min. at room temperature.
12. Repeat Step 9 and remove as much supernatant as possible.
13. Add 1 mL of Washing Solution (B) to the pellet and vortex.

14. Centrifuge at $12,000 \sim 20,000 \times g$ for 5 min. at room temperature.
15. Repeat Step 9 and remove as much supernatant as possible.
16. Dry the pellet well for about 5 min. on the block heater at about 65°C .
17. Add adequate volume ($10 \sim 20 \mu\text{L}$) of TE (pH 8.0) or D.W. to the pellet.
18. Dissolve the pellet completely with vortex mixer and incubation at about 65°C for 3 ~ 5 min.
19. Store at -20°C for long-term storage.

3. Alternative protocol : 200 μL of sample

If you start the experiment from 200 μL of sample, refer to the below procedure.
This protocol may decrease the DNA yield and purity compared to the Standard protocol.

1. Dispense 200 μL of serum or plasma to a plastic 2 mL microcentrifuge tube.
2. Add 300 μL of Enzyme Reaction Solution and mix briefly.
3. Add 8 ~ 10 μL of Protein Digestion Solution cooled on ice and vortex.
4. Incubate at 56°C for 30 min.

It is possible to store the solution of this step at 4°C or -20°C for up to one week.

5. Add 400 μL of Sodium Iodide Solution and mix briefly.
6. Add 900 μL of Alcohol Solution and vortex.
7. Incubate at room temperature for 10 min.
8. Centrifuge at $12,000 \sim 20,000 \times g$ for 10 min. at room temperature.
9. Decant and remove the supernatant as much as possible from the tube that is inverted and placed on a paper towel.
10. Add 1.5 mL of Washing Solution (A) to the pellet and vortex.

It is possible to store the solution at -20°C for long term.

11. Centrifuge at $12,000 \sim 20,000 \times g$ for 5 min. at room temperature.
12. Repeat Step 9 and remove as much supernatant as possible.
13. Add 1.5 mL of Washing Solution (B) to the pellet and vortex.
14. Centrifuge at $12,000 \sim 20,000 \times g$ for 5 min. at room temperature.
15. Repeat Step 9 and remove as much supernatant as possible.
16. Dry the pellet well for about 5 min. on the block heater at about 65°C .
17. Add adequate volume ($10 \sim 20 \mu\text{L}$) of TE (pH 8.0) or D.W. to the pellet.
18. Dissolve the pellet completely with vortex mixer and incubation at about 65°C for 3 ~ 5 min.
19. Store at -20°C for a long-term storage.

[Application data] Result of amplification of p53-Exon5 region:

By using DNA Extractor SP Kit, DNA was extracted from 10 human sera and one plasma sample. The extracted DNA was finally resolved in 20 μL of TE (pH 8.0), and 5 μL of that was added to the PCR. Commercial available kit based on a glass binding method (spin column method) was used as a comparative method.

Result of amplification of p53-Exon5 region

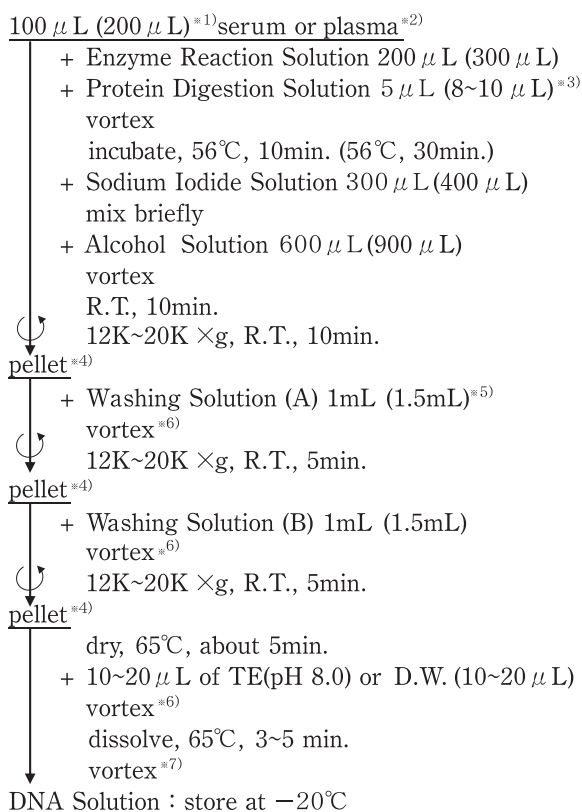


All samples extracted by DNA Extractor SP Kit was able to be amplified in the region of p53-Exon 5. In this experiment, we found that the amount of fragment amplified from our kit was larger than that of a competitor's kit. In the competitor's kit, the target fragment could not be observed in the sample of serum 10 and plasma.

PCR condition : 10 μ L reaction

DNA sample	5 μ L			
Exon5 forward-primer	4 pmol	96°C	30 sec.	
Exon5 reverse-primer	4 pmol	94°C	30 sec.	40 cycles
dNTP	200 μ mol/L	65°C	30 sec.	
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	1 μ L	72°C	1 min.	
Gene <i>Taq</i> NT	0.5 units	72°C	5 min.	
<hr/>				
D.W.	fill up to 10 μ L			

Flow chart



- ※1) Grouping symbol means the protocol from 200 μ L of sample.
- ※2) Samples of serum and plasma should be placed on ice for the avoidance of activation of the endogenous DNase. We recommend Enzyme Reaction Solution to be added as soon as possible.
- ※3) Protein Digestion Solution should be placed on ice, during operation.
- ※4) Decant and remove the supernatant as much as possible from the tube that is in verted and placed on paper towel.
- ※5) It is possible to store the solution at -20°C for long term.
- ※6) Mix vigorously until the pellet is removed from wall of tube.
- ※7) Dissolve the pellet completely with vortex mixer and incubation.

[References]

- 1) Ishizawa, M., Kobayashi, Y., Miyamura, T. and Matsuura, S. : *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1774 (1994)
- 2) Sozzi, G., Musso, K., Ratcliffe, C., Goldstraw, P., Pierotti, M. A. and Pastorino, U. : *Clin Cancer Res.*, **5**, 2689 (1999)
- 3) Silva, J. M., Dominguez, G., Garcia, J. M., Gonzalez, R., Villanueva, M. J., Navarro, F., Provencio, M., San, Martin, S., Espana, P. and Bonilla, F. : *Cancer Res.*, **59**, 3251 (1999)
- 4) Shao, Z. M., Wu, J., Shen, Z. Z. and Nguyen, M. : *Clin Cancer Res.*, **7**, 2222 (2001)

Allied products

Wako catalog No.	Description	Package Size
316-90025	TE (pH 8.0)	500 mL
200-14911	10 × TE (pH 8.0)	1 L × 10
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 mL
318-03231	Gene <i>Taq</i> NT (<i>Taq</i> DNA polymerase)	250 units
318-02871	Gene <i>Taq</i> (<i>Taq</i> DNA polymerase)	250 units
312-03491	P53 Primer Exon 2, 3	100 reactions
315-03501	P53 Primer Exon 4	100 reactions
312-03511	P53 Primer Exon 5	100 reactions
319-03521	P53 Primer Exon 6	100 reactions
316-03531	P53 Primer Exon 7	100 reactions
313-03541	P53 Primer Exon 8, 9	100 reactions
310-03551	P53 Primer Exon 10	100 reactions
317-03561	P53 Primer Exon 11	100 reactions

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

遺伝子研究用
DNA エキストラクター SPキット
Serum and Plasma

【はじめに】

本 DNA エキストラクター SP キットは、DNA エキストラクターキットを改良し、血清 (Serum) または、血漿 (Plasma) 中に存在する DNA 断片の抽出に特化した新規の DNA 抽出キットです。

近年、癌細胞など疾患の原因細胞に由来する DNA の断片が血液中に浮遊していることが知られるようになり、文献報告が数多くなされています。最近では、海外および国内においても癌などの早期診断あるいは病状のモニタリングとして、この血中遊離 DNA を使って遺伝子診断を行おうとする研究が進みつつあります。本 DNA エキストラクター SPキットは、非常に高い DNA 回収率が可能であることから目的とする遺伝子を高感度に検出、解析するための前処理用試薬として有用なキットです。さらに、本キットは、これまでの弊社のエキストラクターシリーズ同様よう化ナトリウム法に基づく簡易抽出法を採用しているため、劇物であるフェノール / クロロホルムを使用することなく、1 本のマイクロ遠心分離チューブ内で一連の操作を全て行うことができます。

【特 長】

- ・少量 (100 μ L) の血清や血漿サンプルから、高い回収率で DNA を取得することができます。
- ・よう化ナトリウム法に基づく抽出法を採用しているため、100%に近い DNA 回収率です。
- ・フェノール、クロロホルムなどの劇物を使用していないため、安全に操作できます。
- ・シリカ担体などを使った固相抽出法を行わないため、担体への吸着による微量 DNA のロスが生じません。
- ・一連の操作をすべて 1 本のマイクロ遠心分離チューブ内で行えるため、外来遺伝子のコンタミネーションを最低限度に抑えることができます。
- ・血液サンプル由来の脂質類も特別に調製したアルコール液で完全に除去できます。
- ・PCR 阻害が認められない良質の DNA サンプルが取得できます。

【キット内容】

1) 酵素反応液	10mL \times 1 本
2) タンパク分解酵素液	250 μ L \times 1 本
3) よう化ナトリウム溶液	15mL \times 1 本
4) アルコール液	30mL \times 1 本
5) 洗浄液 (A)	50mL \times 1 本
6) 洗浄液 (B)	50mL \times 1 本

【キット以外に準備する物】**試 薬：**

1) TE (pH 8.0) または D.W. (Distilled Water) などのサンプル溶解液

器 具：

- 1) 1.5mL 容量マイクロ遠心分離チューブ
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) インキュベーター
- 4) 高速微量遠心分離機
- 5) ブロックヒーターなどの乾燥器

【保 存】

冷蔵保存 (2℃～10℃)

【使用期限】

2 年間 (ラベルに表示)

【使用回数】

50 回 (サンプル量：100 μ L)

25 ～ 30 回 (サンプル量：200 μ L)

【操作方法】**1. 操作前の注意点**

- よう化ナトリウム溶液の保存中に結晶が析出した場合は、50℃～60℃程度に加熱して、完全に溶解後、使用して下さい。
- タンパク分解酵素液を実験に使用する場合は、氷上で取り扱って下さい。それ以外の試薬は、室温で取り扱えます。
- 血清 (血漿) 検体は、氷上で取り扱って下さい。血清 (血漿) 中の DNase が働きますので、なるべく早めに酵素反応液を添加して下さい。

2. サンプル 100 μ L からの操作法

1. 血清 (または血漿) を 100 μ L、1.5mL 容マイクロ遠心分離チューブに分注します。
2. 酵素反応液を 200 μ L 添加し混合します。
3. 氷上のタンパク分解酵素液を 5 μ L 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
4. 56℃で 10 分間、インキュベートします。

最後まで滞りなく本プロトコルを終えることをお勧めしますが、中断を余儀なくされた場合は、1 週間以内ならば、4℃または - 20℃でこの反応液を保存することができます。

5. よう化ナトリウム溶液を 300 μ L 添加して、軽く混合します。
6. アルコール液を 600 μ L 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
7. 室温で 10 分間、放置します。
8. 12,000 ～ 20,000 \times g で 10 分間、室温で遠心分離します。
9. 上清を捨て、ペーパータオルの上にチューブを逆さにして置き、そこにチューブを押さえつけて残りの上清液をできるだけ除きます。
10. 沈殿に、洗浄液 (A) を 1mL 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。

長期保存の場合は、この状態で - 20℃保存して下さい。

11. 12,000 ~ 20,000 × g で 5 分間、室温で遠心分離します。
12. ステップ 9 と同様の操作を行い残りの上清液をできるだけ除きます。
13. 沈殿に、洗浄液 (B) を 1mL 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
14. 12,000 ~ 20,000 × g で 5 分間、室温で遠心分離します。
15. ステップ 9 と同様の操作を行い残りの上清液をできるだけ除きます。
16. ブロックヒーター (約 65℃) など、約 5 分間、沈殿を乾燥させます。
17. 乾燥した沈殿に、適量 (例えば 10 ~ 20 μL) の TE (pH 8.0)などを添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
18. ブロックヒーター (約 65℃) など、3 ~ 5 分間ほど加温しつつ、ボルテックスミキサーで攪拌して沈澱を完全に溶解させます。
19. 抽出した DNA 溶液は、- 20℃で長期保存できます。

3. サンプル 200 μL からの操作法：

本キットは、標準プロトコールとしてサンプル量 100 μL からのスタートですが、目的遺伝子の濃度が低いなどの理由で 200 μL からスタートしたい場合は、下記のプロトコールに従って下さい。ただし、DNA 回収率や精製度など若干落ちる可能性がありますので、目的遺伝子の解析などご使用に問題のない場合に参考にして下さい。なお、本キットは、200 μL の検体を対象とする場合、およそ 25 ~ 30 回用のキットとなります。

1. 血清 (または血漿) を 200 μL、2mL 容マイクロ遠心分離チューブに分注します。
2. 酵素反応液を 300 μL 添加します。
3. 氷上のタンパク分解酵素液を 8 ~ 10 μL 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
4. 56℃で 30 分間、インキュベーションします。

最後まで滞りなく本プロトコールを終えることをお勧めしますが、中断を余儀なくされた場合は、1 週間以内ならば、4℃または - 20℃でこの反応液を保存することができます。

5. よう化ナトリウム溶液を 400 μL 添加して、軽く混合します。
6. アルコール液を 900 μL 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
7. 室温で 10 分間、放置します。
8. 12,000 ~ 20,000 × g で 10 分間、室温で遠心分離します。
9. 上清を捨て、ペーパータオルの上にチューブを逆さにして置き、そこにチューブを押さえつけて残りの上清液をできるだけ除きます。
10. 沈殿に、洗浄液 (A) を 1.5mL 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。

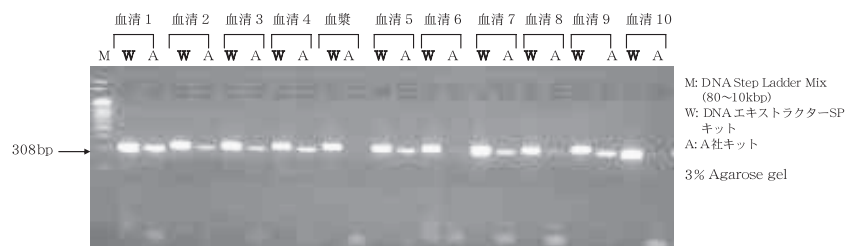
長期保存の場合は、この状態で - 20℃保存して下さい。

11. 12,000 ~ 20,000 × g で 5 分間、室温で遠心分離します。
12. ステップ 9 と同様の操作を行い残りの上清液をできるだけ除きます。
13. 沈殿に、洗浄液 (B) を 1.5mL 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
14. 12,000 ~ 20,000 × g で 5 分間、室温で遠心分離します。
15. ステップ 9 と同様の操作を行い残りの上清液をできるだけ除きます。
16. ブロックヒーター (約 65℃) など、約 5 分間、沈澱を乾燥させます。
17. 乾燥した沈澱に、適量 (例えば 10 ~ 20 μL) の TE (pH 8.0)などを添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
18. ブロックヒーター (約 65℃) など、3 ~ 5 分間ほど加温しつつ、ボルテックス

ミキサーで攪拌して沈澱を完全に溶解させます。
 19. 抽出した DNA 溶液は、- 20℃で長期保存できます。

【実施例データ】 ヒト血清および血漿中から抽出した DNA の p53-Exon5 領域の増幅：
 本キットを用いて、ヒト血清（10 サンプル）およびヒト血漿（1 サンプル）から DNA を抽出し、20μL の TE（pH 8.0）に溶解した DNA 試料の内 5μL に対して、それぞれ p53-Exon5 領域（308bp）の増幅を行った。対照として、シリカ担体（遠心ろ過法）を抽出原理としている A 社 DNA 抽出キットを用いた例を比較した。

p53-Exon5 の PCR 結果

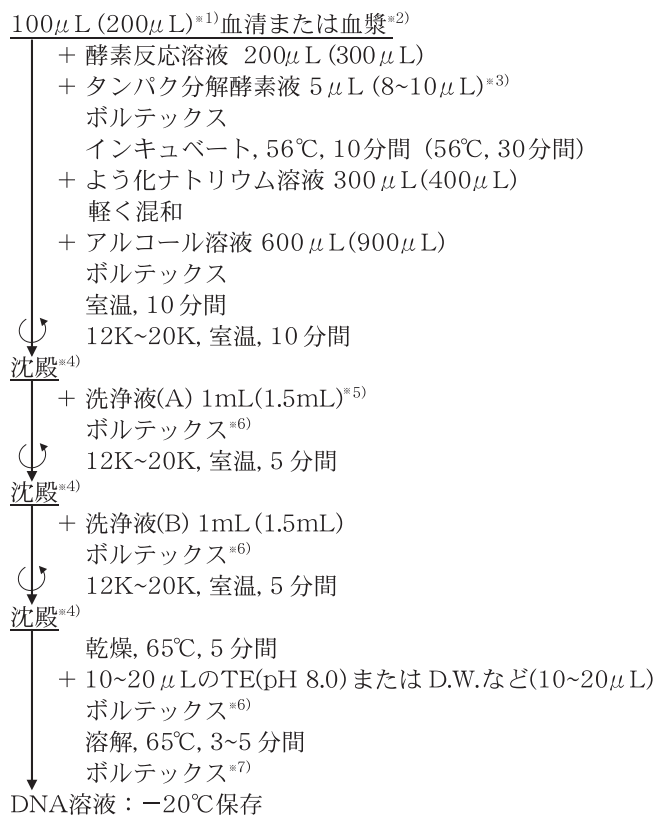


本キットで抽出した 11 サンプルすべてにおいて、p53-Exon5 領域の PCR 断片が認められた。また、全サンプルにおいて PCR 増幅断片の DNA 量は、A 社キットより多く、本キットの DNA 抽出効率の高さを示す結果であった。A 社キットでは、血漿および血清 10 に おいて全く PCR 増幅断片を得ることができなかった。

PCR 反応液の条件：10μL 反応系

DNA 溶液	5μL			
Exon5 forward-primer	4pmol	96℃	30sec.	
Exon5 reverse-primer	4pmol	94℃	30sec.	
dNTP	200μmol/L	65℃	30sec.	40cycles
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	1μL	72℃	1min.	
Gene <i>Taq</i> NT	0.5units	72℃	5min.	
D.W.	10μL に fill up			

フローチャート



※1) ()内は、200 μ Lのサンプルからスタートしたときのプロトコールです。

※2) 血清(血漿)検体は、氷上で取り扱って下さい。血清(血漿)中のDNaseが働きますので、なるべく早めに酵素反応液を添加して下さい。

※3) キットから取り出し、予め氷上に移してから使用して下さい。

※4) 上清を捨て、ペーパータオルの上にチューブを逆さにして置き、そこにチューブを押さえつけて残りの上清液をできるだけ除きます。

※5) 洗浄液(A)を加えた後、-20°C保存で長期保存することができます。

※6) 沈殿が器壁から剥がれるまで十分に混和して下さい。

※7) 完全に沈殿がなくなるまで溶解して下さい。

【参考文献】

- 1) Ishizawa, M., Kobayashi, Y., Miyamura, T. and Matsuura, S. : *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1774 (1994)
- 2) Sozzi, G., Musso, K., Ratcliffe, C., Goldstraw, P., Pierotti, M. A. and Pastorino, U. : *Clin Cancer Res.*, **5**, 2689 (1999)
- 3) Silva, J. M., Dominguez, G., Garcia, J. M., Gonzalez, R., Villanueva, M. J., Navarro, F., Provencio, M., San, Martin, S., Espana, P. and Bonilla, F. : *Cancer Res.*, **59**, 3251 (1999)
- 4) Shao, Z. M., Wu, J., Shen, Z. Z. and Nguyen, M. : *Clin Cancer Res.*, **7**, 2222 (2001)

関連製品

Code No.	品 名	容 量
316-90025	TE (pH 8.0)	500mL
200-14911	10 × TE (pH 8.0)	1L 用 × 10
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500mL
318-03231	Gene <i>Taq</i> NT (Taq DNA polymerase)	250units
318-02871	Gene <i>Taq</i> (<i>Taq</i> DNA polymerase)	250units
312-03491	P53 Primer Exon 2, 3	100回分
315-03501	P53 Primer Exon 4	100回分
312-03511	P53 Primer Exon 5	100回分
319-03521	P53 Primer Exon 6	100回分
316-03531	P53 Primer Exon 7	100回分
313-03541	P53 Primer Exon 8, 9	100回分
310-03551	P53 Primer Exon 10	100回分
317-03561	P53 Primer Exon 11	100回分

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2305KA3